Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Heidelberg
Vorstand: Professor Dr. Oehme

Cholesterin und Karotinoidstoffwechsel bei Hypo- und Hyperthyreose

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der hohen medizinischen Fakultät
der Ruprecht-Karls-Universität zu
Heidelberg

vorgelegt von

Ilse Liebold
aus Bockwa i. Sa.

1 9 3 5
Brausdruck G. m. b. H., Heidelberg

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Heidelberg

Referent:
Prof. Dr. Oehme

Dekan:
Prof. Dr. Schneider

1935

Ueber die Beziehungen zwischen Cholesterin und Karotinoidstoffwechsel sind in der Literatur nur spärliche Angaben zu finden. Besser unterrichtet sind wir über die Zusammenhänge zwischen Cholesterin und Vitamin D. Erst nachdem Vitamin A rein dargestellt und in seiner Konstitution von Karrer geklärt wurde, ließen sich exaktere Untersuchungen anstellen über die mutmaßlichen Beziehungen zwischen A-Vitamin und Cholesterin.

1923 begründeten Collazo und Hamburger die Hypothese einer Wechselwirkung zwischen Vitamin A und Cholesterin durch Fütterungsversuche an Meerschweinchen mit Dorschlebertran. Ihre Untersuchungen besaßen aber insofern keine Beweiskraft, als keine sichere Unterscheidung zwischen A- und D-Vitaminwirkung vorgenommen werden konnte. Es blieb zweifelhaft, auf welchen Vitaminfaktor die erzielten Wirkungen zu beziehen wären. Die Autopsie der an A-Vitaminose verendeten Tiere ergab einen beträchtlichen Rückgang des Cholesteringehaltes im subkutanen Zellgewebe, im Bauchfell, in der Nebennierenrinde sowie in der Leber. Ralli und Waterhouse berichteten über Versuche, die beweisen sollten, daß bei Hunden, deren Blutcholesterinspiegel durch Karolin-Vitamin A-arme Ernährung gesteigert worden war, ein Ausgleich der erhöhten Cholesterinwerte durch Fütterung mit Karotin erzielt werden kann. Kimura konnte mit Lebertran, der Vitamin A- und D-haltig ist, keine so eindeutigen Wirkungen erreichen. Der durch Cholesterinfütterung in die Höhe getriebene Cholesterintiter im Blut konnte zwar durch Lebertrangaben langsam gesenkt werden, aber diese Senkung schien ebenso rasch spontan auftreten zu können nach dem Aussetzen der Cholesterinzufuhr ohne Lebertrangaben. Im Widerspruch zu den Befunden von Ralli und Waterhouse stehen auch die Beobachtungen von Manzini, welcher bei Karotinikterus (ausgelöst durch Gemüsekost) eine Erhöhung des Blutcholesterins nachwies. Nachdem wir die Abklärung der Frage der Wechselwirkung von Karotin-Vitamin A-Cholesterin erneut experimentell in Angriff genommen hatten, erschienen die folgenden Untersuchungsergebnisse, die eine klare Entscheidung bereits zu geben vermochten. Jusatz konnte durch Verfütterung von Vogan (Vitamin A-Konzentrat Merck) den Serumcholesterinspiegel um etwa 180% erhöhen. Collazo, Torres und Sanchez-Rodriguez untersuchten den Gesamtcholesterinstoffwechsel im Blut und

in den Organen im Zusammenhang mit Vitamin A unter verschiedenen Versuchsbedingungen. A-avitaminotische Ratten zeigten eine Verringerung des Cholesteringehaltes im Blut und in den Organen, bei A-Hypervitaminose wurde umgekehrt eine Steigerung des Cholesterins festgestellt. Diese Ergebnisse stellen den inneren Zusammenhang zwischen Cholesterin- und Karotinoidstoffwechsel sicher.

Da eine Reihe von Beobachtungen vorliegen, die auf eine Abhängigkeit des Cholesterinstoffwechsels von der Schilddrüsenfunktion hinweisen, erhob sich die Frage, ob etwa auch das Karotin bzw. A-Vitamin in dieses Abhängigkeitsverhältnis mit eingreift, zumal zwischen Vitamin A und Thyroxin nach Euler und Abelin ein gegensätzliches Wirkungsverhältnis besteht.

Folgende Untersuchungen liegen vor über den Zusammenhang zwischen Cholesterinstoffwechsel und Schilddrüsenfunktion: Heckscher und Messina beobachteten nach der Thyreodektomie eine Cholesterinvermehrung im Blut und in den Nebennieren, die sie als Folge einer Hemmung der Cholesterinspaltung ansahen. Kunde konnte in seinen Versuchen an thyreodektomierten Ratten im Blut eine Cholesterinsteigerung von über 100% gegenüber normalen Kontrolltieren nachweisen. Die gleichen Ergebnisse hatte Fukai am thyreodektomierten Meerschweinchen. Thyroxingaben bedingen regelmäßig bei normalen Tieren eine Verminderung des Cholesterins im Blut und in den Organen. Das geht hervor einerseits aus den Hundeversuchen von Blinoff, der nach intravenöser Thyroxinzufuhr regelmäßig eine erhebliche Verminderung des Blutcholesterins nachwies — bei kastrierten Hunden war die Auswirkung des Thyroxins etwas weniger ausgeprägt —, andererseits aus den Versuchen von Sakurai, welcher am Meerschweinchen den durch Thyreodektomie hervorgerufenen Anstieg des Blutcholesterins durch Einspritzen von Schilddrüsensubstanz hemmen konnte. Als wirksame Grenzdosis des Thyroxins bestimmte er 0,05 gr Schilddrüsensubstanz pro kg Körpergewicht. Bei 0,005 Gramm Schilddrüsensubstanz trat keine Aenderung des Blutcholesterinwertes ein; 0,05 gr verursachten einen starken Abfall desselben. Westra und Kunde stellten fest, daß die nach Thyreoidea-Gaben eintretende Abnahme des Blutcholesterins keinerlei Beziehungen zur Zahl der roten Blutkörperchen oder dem Hämoglobingehalt des Blutes zeigt. In den Organen, speziell Leber und Nebennieren, sollen sich Thyroxingaben in dem Sinne auswirken, daß eine erhebliche Fettinfiltration der Leberzellen eintritt, (Oshima) und daß der Cholesteringehalt der Nebennieren eine Vermehrung erfährt (Heckscher). Abelin und Mitarbeiter konnten eine Leberverfettung bei Ratten freilich nicht feststellen. Sakai, welcher im Meerschweinchenexperiment einen erheblichen Anstieg des Lebercholesterins sowie geringe Vermehrung des Cholesterins in den Nebennieren durch Thyroxingaben nachwies, betont, daß die Ten-

denz zur Steigerung des Lebercholesterins starken individuellen Schwankungen unterworfen sei und daß eine gewisse Abhängigkeit des Cholesteringehaltes der Leber vom Körpergewicht der Versuchstiere bestehe. Levy führte auf Grund der tierexperimentellen Befunde die ersten Untersuchungen des Blutcholesterins am Myxoedemkranken durch. Die Hypercholesterinaemie des Myxoedematösen ließ sich durch Thyroxinbehandlung erheblich mindern. Nach Aussetzen der Thyroxingaben stieg der Cholesterinspiegel erneut wieder an.

Daß das Karotin bzw. Vitamin A auch seinerseits in Wechselbeziehungen zur Schilddrüse tritt, wird in neueren Arbeiten mehrfach hervorgehoben. Die darauf abzielenden Untersuchungen scheinen im Sinne einer antagonistischen Wirkung beider Stoffe zu sprechen.

Karotin-Vitamin A-Gaben sollen nach Abelin die Toleranz für Thyroxin heraufsetzen, Thyroxingaben umgekehrt den Vitamin-A-Verbrauch steigern. Der gleiche Befund wurde von Wagner erhoben und auf eine Oxydationssteigerung durch Thyroxin bezogen. Fasold und Peters erzeugten durch reichliche Zufuhr von A-Vitamin (Vogan Merck) eine Hypervitaminose, die nach 4 Wochen zum Tode führte. Verabreichten sie aber neben dem Vogan noch Thyroxin, so blieben die Tiere gesund und entwickelten sich normal. Wie sich A-Hypervitaminose durch Thyroxin günstig beeinflussen ließ, so konnte Moeller auch die Thyreotoxikose durch Karotin bessern. Auch der Leberstoffwechsel soll diesem Antagonistenspiel unterworfen sein. Thyroxingaben bewirken nach Abelin einen Schwund des Karotins, gleichzeitige Zufütterung von Karotin soll diesen Schwund verhindern und sekundär zu einer Wiederanreicherung des Vitamins in der Leber führen. Das Karotin verhält sich also nach Abelin ähnlich wie das Glykogen und Fett im Lebergewebe. Auch diese Stoffe nehmen mengenmäßig unter dem Einfluß einer Thyroxinbehandlung wesentlich ab. v. Euler prüfte den Einfluß verschieden großer Thyroxingaben und Karotingaben auf den Gesamtstoffwechsel. Er kam zu dem Ergebnis, daß Karotin die durch Thyroxin an sich ausgelöste Gewichtsabnahme hemmt oder gänzlich verhindert. Nicht nur die experimentelle Hyperthyreose, sondern auch den menschlichen Basedow hat man durch die Verabreichung einer sehr A-vitaminreichen Kost zu beeinflussen versucht. Abelin berichtet über solche Versuche sehr optimistisch und spricht dabei nicht nur von angeblichen Besserungen, sondern sogar von Heilungen. Auch das Längenwachstum des jugendlichen Knochens und die Gewichtskurve wachsender Tiere werden durch Vitamin A und Thyroxin genau gegensätzlich beeinflußt (v. Euler, Klußmann). Abelin ist es auch gelungen, im Reagenzglas das Karotin durch Zugabe von Thyroxin zu zerstören; möglicherweise

reagieren beide Substanzen chemisch miteinander und machen sich unwirksam (Stepp und Kühnau).

Zur Aufklärung der möglichen inneren Zusammenhänge zwischen Schilddrüsenfunktion — Cholesterin und Karotinoid — Vitamin A-Haushalt schienen uns Bilanzversuche an hyper- und hypothyreotischen Tieren beizutragen. Da der Karotinoidgehalt des Serums nach Palmer und Eckles einen gewissen Parallelismus aufweisen soll zu demjenigen der Leber, und da die Leber als die Centralbildungs- und Speicherungsstelle des A-Vitamins bzw. des Provitamins Karotin nach Moore anzusprechen ist, führten wir Bilanzversuche an den entsprechenden frisch gewonnenen Lebergeweben durch. Im Hinblick auf die von Stepp beobachtete Karotinanreicherung in der Nebenniere, die freilich von Randoin bei normal ernährten Ratten nicht bestätigt werden konnte, und im Hinblick auf die Bedeutung, die der Nebenniere für den Cholesterinstoffwechsel zukommt, zogen wir das Nebennierengewebe in unseren Untersuchungsbereich mit ein.

Methodik der Tierversuche.

Die Versuchstiere, junge weiße Ratten, wurden auf eine Kost folgender von Brockmann angegebener Zusammenstellung gesetzt: 40 Teile Reisstärke, 20 Teile Casein, 15 Teile Dextrin, 15 Teile Palmin, 5 Teile Trockenhefe, 5 Teile Mac Collum-Salzgemisch. Um einer avitaminotischen Schädigung vorzubeugen, wurde als Zusatz 2×0,5 ccm Detavit gegeben (Detavit = A D-Konzentrat). Die Fütterungsperiode dauerte jeweils 12 Tage. Alle Versuche wurden innerhalb von 2 Monaten durchgeführt. Die Cholesterinbestimmung in den frisch gewonnenen Organen wurde nach der Methode von Thannhauser vorgenommen, da wir nach der Fex'schen Methode ursprünglich immer sehr schwankende Werte in Parallelversuchen erhielten. Die kolorimetrische Bestimmung des Karotins wurde nach den Angaben von Kuhn und Brockmann durch Vergleich mit einer Azobenzolstandardlösung im Stufenphotometer ausgeführt.

Cholesterinbestimmung nach Thannhauser.

Die den getöteten Tieren sofort entnommenen Organe (Leber) wurden mit Ausnahme der Nebennieren gefroren und zermörsert. Nach Versetzung mit Gips und Ueberschichtung mit Aether wurde zunächst 4mal in der Hand je 3—5 Minuten ausgeschüttelt, dann 4mal je ½ Stunde in der Schüttelmaschine (bei der letzten Ausschüttelung muß Liebermann-Burckhardt negativ sein). Der gesammelte Aether wurde bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit 25 Tropfen Chloroform und 10 ccm Alkohol versetzt, nochmals filtriert und mit Aether nachgewaschen. Nach Abdampfung des Aethers im Wasserbad wurde das freie Cholesterin

mit 1% Digitoninlösung in 80% Alkohol gefällt. Nach 12 Stunden wurde an der Saugnutsche mit vorher gewogenem Filter abfiltriert, der Rückstand 2—3mal mit je 2 ccm Digitoningesättigter Alkohollösung, dann mit ca. 10 ccm Aether 4—5mal nachgewaschen, drei Stunden bei 100° getrocknet und gewogen. Zur Bestimmung des Gesamtcholesterins wurde nach Abdampfung des Aethers erst drei Stunden mit 0,5 gr metallischem Natrium gekocht. Der weitere Versuchsverlauf war der gleiche wie bei freiem Cholesterin.

Zur Bestimmung des Karotinoidgehaltes wurden die abgewogenen Organmassen unter Methanol zerrieben, auf einer Glassinternutsche abgesaugt und unter kräftigem Reiben 3mal mit ca. 20 ccm Methanol und 4mal mit 30 ccm Benzin extrahiert. Zusatz von reichlich Wasser führte den größten Teil des Vitamins in die Benzinschicht über; die wässrig-alkoholische Lösung wurde nochmals mit wenig Benzin ausgeschüttelt. Die kolorimetrische Bestimmung erfolgte in dem eingeengten Benzinextrakt durch Vergleich mit einer Azobenzolstandardlösung in Stufenphotometer.

Ergebnisse.

Serie I als Normalserie (12 Tiere) wurde 12 Tage unter der angegebenen Kost plus 2mal 0,5 ccm Detavit gehalten. Das Mittelgewicht der Tiere bei Versuchsbeginn betrug 152,8 gr, bei Versuchsende 141,4 gr; die Lebern wogen insgesamt 82 gr, die Nebennieren 560 mgr. Die Nebennieren erwiesen sich als äußerst cholesterinreich; der Benzinextrakt zur Karotinbestimmung zeigte keine gelbe Färbung; die $SbCl_3$ Reaktion, die von allen Karotinoiden gegeben wird (v. Euler), fiel negativ aus. Der Benzinextrakt der Lebern war kräftig gelb gefärbt und reagierte auf (Carr-Price)$SbCl_3$ mit guter Blaufärbung (Zahlenangaben siehe Tabelle).

Serie II = hypothyreotische Ratten:

Die Versuchstiere wurden nach der Thyreodektomie noch vier Tage unter Vollkost gehalten, bekamen dann 12 Tage Standardkost plus 2mal 0,5 ccm Detavit. Bei Versuchsbeginn war das Mittelgewicht 149,9 gr, bei Versuchsende 147 gr; das Gesamtlebergewicht betrug 70 gr, das der Nebennieren 420 mgr. Das Gesamtcholesterin nahm nur in der Konzentration, nicht im absoluten Gewicht zu. Der Lebercholesterinspiegel war etwa gleich geblieben. Die Carr-Price-Reaktion fiel in dem auch bei stärkster Einengung völlig farblosem Benzinextrakt der Nebennieren wieder negativ aus. Der gelbe Leberextrakt reagierte mit $SbCl_3$ positiv; das Leberkarotin war im Vergleich zur Normalserie um etwa 10% gesunken.

Bekanntlich gelingt vollständige Schilddrüsenentfernung bei Ratten nie mit völliger Sicherheit (Krager). Der Poliklinik stehen hierüber histologische Kontrollserien zur Verfügung. Die histologische Untersuchung der Trachealschnitte dieser Serie ergab ein günstiges Bild: von 12 Tieren waren 6 in ihren Serienschnitten völlig

frei von Schilddrüse, bei 4 war noch vereinzelt Schilddrüsensubstanz nachzuweisen, 2 hatten noch reichlich Thyreoideareste.

Serie III = hyperthyreotische Ratten:

Nach 12 Tagen Standardkost, 2mal 0,5 ccm Detavit und 10mal 50 γ Thyroxin zeigten die Tiere noch keine wesentlichen Erscheinungen des Hyperthyreoidismus. Die Gewichtsabnahme während der Versuchsdauer betrug vom mittleren Anfangsgewicht = 161,5 gr auf ein Mittelgewicht von 142,3 gr bei Versuchsende 19,2 gr. Die Lebern wogen insgesamt 55 gr, ihr Gewicht war im Vergleich zu Serie I und II wesentlich verringert, das Gesamtgewicht der Nebennieren dagegen mit 700 mgr erhöht. Bei der Cholesterinbestimmung konnte an den Nebennieren eine Steigerung des Gesamtcholesterins parallel der Gewichtszunahme gegenüber der Normalserie festgestellt werden. Das freie Cholesterin wurde trotz des höheren Organgewichtes nicht erhöht gefunden. Im Cholesteringehalt der Leber wurden keine Unterschiede, die außerhalb der Fehlergrenze liegen, gefunden. Karotin konnte in den Nebennieren auch in diesem Versuch durch $SbCl_3$ nicht nachgewiesen werden. Der Leberextrakt war sehr viel stärker gelb gefärbt als bei der Normalserie. Die kolorimetrische Bestimmung ergab einen Wert, der weit über dem der Normalserie lag.

Unsere Untersuchungsergebnisse weichen also ab von den früheren Einzelbeobachtungen Sakai's und Oshima's über die Zusammenhänge zwischen Schilddrüsenfunktion und Cholesterinstoffwechsel. Im Gegensatz zu ihnen finden wir bei hyperthyreotischen Tieren ebenso wie Abelin, keine Zunahme des Cholesteringehaltes in der Leber, eine geringe Abnahme in den Nebennieren. In diesem Punkte decken sich unsere Ergebnisse also mit denen von Abelin. — Der Karotingehalt der Leber liegt bei unseren hyperthyreotischen Tieren, die gleichzeitig Karotin in gleicher Menge wie die Normaltiere erhielten, wesentlich über demjenigen der Kontrolltiere. Abelin fand bei normal ernährten hyperthyreotischen Tieren eine erhebliche Abnahme des Karotingehaltes der Leber. Unter dem Einfluß einer Karotinzufütterung kehrte sich die Abnahme des Karotins ins Gegenteil um. Es fand eine erhebliche A-Vitaminanreicherung in der Leber statt trotz der Hyperthyreoidisierung. Da unsere Ratten während der Versuchsdauer 2mal 0,5 ccm Detavit bekamen — also ziemlich reichlich A-Vitamin —, so erhärtet unser Befund die Beobachtung Abelins, daß Karotin der den A-Vitaminverbrauch steigernden Hyperthyreosewirkung entgegenarbeitet. Die Leber verliert unter dem Einfluß der Hyperthyreose wohl an sich ihren Vitaminreichtum, aber sie büßt nicht ihre Fähigkeit ein, zugefüttertes Vitamin zu speichern. — Zu berücksichtigen ist außerdem noch der hohe Prozentsatz von Casein in unserer Kost; da dieses, nach Untersuchungen von Abelin, die Stoffwechselsteigerung des Thyroxins mildert.

Tabelle über den Cholesterin- bzw. Karotingehalt.

	Serie I	Serie II	Serie III	Absolut. Gewicht:		
				I	II	III
Mittl. Tiergewichte						
vor d. Versuch . .	152,8 gr	149,9 gr	161,5 gr			
nach d. Versuch .	141,4 gr	147 gr	142,3 gr			
Organgewichte						
Leber	82 gr	70 gr	55 gr			
Nebennieren . . .	560mgr	420 mgr	700 mgr			
Leber mg %						
freies Cholest. . .	228,6	209	230	187,4	146,3	126,5
Gesamtcholest. . .	259,1	248	269	212,5	173,5	148 mg
Karotin	5,1	4,05	7,1	2,86	2,84	3,92
Nebennieren mg %						
freies Cholest. . .	1093	2790	895	6,1	11,7	6,1
Gesamtcholest. . .	2480	3260	2440	13,9	13,7	17,2 mg
Karotin	$SbCl_3$ negativ	$SbCl_3$ negativ	$SbCl_3$ negativ			

Serie I = Normalserie,
Serie II = hypothyreotisch,
Serie III = hyperthyreotisch.

Zusammenfassung.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen lassen erkennen, daß die Schilddrüsenfunktion in ihrer Auswirkung auf den Cholesterin-Karotinoidstoffwechsel für das Cholesterin in den Nebennieren, für das Karotin in der Leber hauptsächlich sichtbar wird.

Tatsächlich hat Thyroxin den Karotingehalt der Leber absolut erhöht. Bei Hypothyreose blieben Karotin- wie auch Cholesteringehalt fast unverändert.

An den Nebennieren konnten wir die Befunde von Hoskins und Squier bestätigen, welche durch Schilddrüsenverfütterung bei Ratten eine Gewichtszunahme im allgemeinen mit gleichzeitiger Hypertrophie der Nebennieren feststellen konnten. Das Nebennierengesamtcholesterin stieg bei Thyroxingabe parallel dem Nebennierengewicht. Bei Hypothyreose nahm das Nebennierencholesterin nur in der Konzentration zu, bleibt in absoluter Menge wie normal. Das freie Cholesterin war erhöht.

Zum Schlusse gestatte ich mir, Herrn Professor Dr. Oehme für die freundliche Ueberlassung dieser Arbeit und für seine Hilfsbereitschaft während der experimentellen Vorarbeiten meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Herrn Oberarzt Dr. Paal darf ich für seine wertvolle Unterstützung ebenfalls herzlich danken.